Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 95 (2004)

Heft: 6

Artikel: Zur Analyse von Proteinmustern in Nahrungsmitteln und ähnlichen Matrices

Autor: Wegmüller, Fritz

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-981848

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Zur Analyse von Proteinmustern in Nahrungsmitteln und ähnlichen Matrices*

Fritz Wegmüller, CH-4600 Olten

Einleitung

Auf den Verpackungen von Lebensmitteln sind die Proteingesamtgehalte, nicht aber deren Einzelkomponenten deklariert. Die aktuellen Proteinmuster ihrerseits sind nur in Ausnahmefällen bekannt. Es fehlen automatisierbare Methoden, welche die rasche, robuste und ebenso treffsichere Bestimmung der Proteine, selbst in komplexen Matrices, vollumfänglich garantieren. Ohne aufwendige Vorreinigungen gelingt die Bestimmung der Gehalte von nativen Proteinen mithilfe der bekannten Techniken (z.B. SDS-Page, Chromatographie, Immunologie, Enzymtechnik oder MS) lediglich in Einzelfällen (1, 2). Gesundheits- und Ernährungsfragen und/oder verfahrenstechnisch relevante Fragestellungen, die auf Proteine fokussieren, können deshalb zumeist nur indirekt angegangen werden.

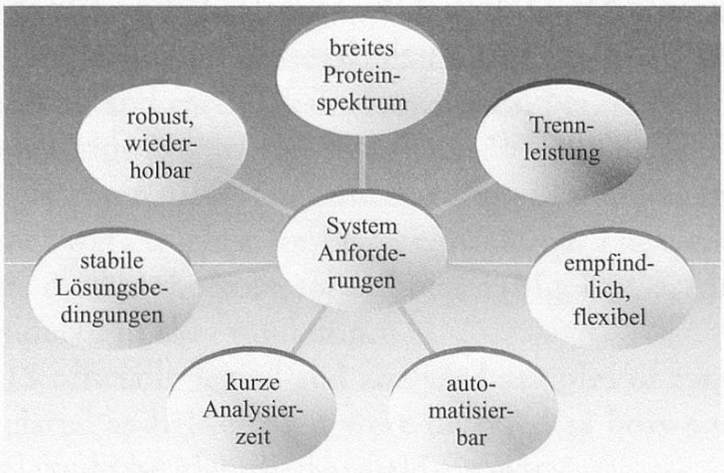

Abbildung 1 **Anforderungen an das HPLC-Trennsystem zur Bestimmung von Proteinmustern in Lebensmitteln oder Lebensmittel-ähnlichen Matrizen**

*Poster präsentiert an der Jahresversammlung der SGLUC vom 9./10. September 2004

Das Ziel dieser Arbeit war ein Trennverfahren zu entwickeln, das die rasche und treffsichere Bestimmung von Proteinmustern ermöglicht. Es galt also eine Methode zu erarbeiten, die den Anforderungen der Abb. 1 genügt, d.h. die Proteine hinreichend trennt und die häufig auftretenden Interferenzen, wie Ausfällungen, Polymerisationen, Adsorptionen, Komplexbildungen und Degradationen von Proteinen unterbindet bzw. minimiert (3–7).

Methodisches

– Das LC-Trennsystem allgemein

In umfangreichen Vorversuchen mit Proteinstandards von Milchweiss und Eiklar erwies sich das zweidimensionale LC-Trennsystem Gelchromatographie (SEC) – Anionenchromatographie (AEX) als die erfolgversprechendste Trennvariante (Abb. 2), obwohl im Einzelbetrieb beide Säulen die Proteine der Referenzlösungen «Milcheiweiss» und «Eiklar» nur unzureichend auftrennten. Die SEC-Säule war der AEX-Säule vorgeschaltet. Über ein zeitgesteuertes Ventil wurde pro SEC-Trennung je eine Eluatfraktion in einem Loop zwischengespeichert und anschliessend zur Bestimmung eines einzelnen Proteins auf der AEX-Säule erneut aufgetrennt. Die Trennung auf der SEC-Säule erfolgte isokratisch. Die Trennung auf der AEX-Säule wurde mittels eines linearen Natriumchlorid-Gradienten ausgeführt. Die Eluate beider Säulen wurden unter UV- und/oder Fluoreszenzlicht detektiert.

– Die HPLC-Apparatur

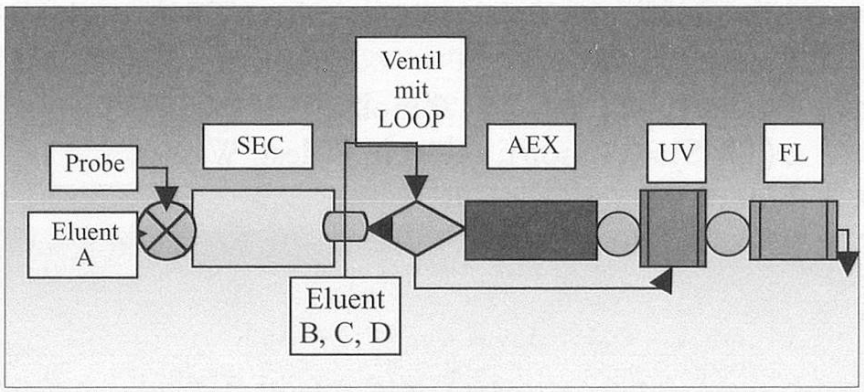

Abbildung 2 **Das Schema der verwendeten HPLC-Apparatur**

– Geräte und weitere Hilfsmittel

HPLC	Thermoquest-HPLC-Anlage, 2 Pumpen, Thermo Finnigan, CH-Allschwil.
Ventil/Loop	Ventil (zeit)gesteuert, Loop: aus Stahl, rostfrei, 0,75 mm×2,3 m.
Trennsäulen	SEC: Shodex KW 803 (incl. Vorsäule), Waters AG, CH-Rupperswil.

AEX: EC50/4 Nucleosil 4000-7PEI (ohne Vorsäule), Macherey-Nagel, CH-Oensingen.

Detektoren UV: Focus; FL: Jasco FL 920, Thermo Finnigan, CH-Allschwil.

Laborzentrifuge (Rotanda, Hettich, 3000 g) und allgemeines Laborequipment.

- Proteinstandards

  β-Lactoglobulin (β-LG) (L 2506, >80 %), α-Lactalbumin (α-LA)(49030, >90 %), α-Casein (α-Cas) (22084, >90 %), β-Casein (β-Cas)(22086, >80 %), Lactoferrin (LF) (61322, >75 %), Ovalbumin (OA)(A5503, >99 %), Conalbumin (CA) (C 0755), Trypsininhibitor (T 2011), Fluka AG/Sigma AG, CH-Buchs.

- Chemikalien

  Harnstoff p.A., Thioharnstoff p.A., TRIS p.A., Natriumchlorid p.A., di-Natriumhydrogen-phosphat p.A., Merck AG, D-Darmstadt.

  Lösungsmittel: Wasser, bidestilliert.

- Lösungen

  Proteinstandards einzeln oder vermischt: je ca. 5–10 mg je Standard in 10 ml Eluent A gelöst, bei chromatographischen Anwendungen bis zu 50× verdünnt mit Eluent A.

  Proteingemisch «Milcheiweiss»: β-Lactoglobulin, α-Lactalbumin, α-Casein und β-Casein vereinigt.

  Proteingemisch «Eiklar»: Ovalbumin, Ovomucin und Conalbumin vereinigt.

  Eluent A: c (Na_2HPO_4, TRIS, Thioharnstoff) = 0,001 mol/l, c (Harnstoff) = 0,01 mol/l, pH: 8 (eingestellt mit c (TRIS) = 0,1 mol/l); gelöst in Bidest. Wasser.

  Eluent B: Eluent A + c (NaCl) = 1,0 mol/l

  Eluent C: c (TRIS) = 0,1 mol/l; gelöst in Bidest. Wasser.

  Eluent D: Bidest. Wasser.

  Waschen der Säulen nach mehrtägigem Gebrauch und bei ungenügender Trennleistung:

  Eluent C + c (CF_3COOK) = 0,1 mol/l
  (AEX: 70° C/ca. 1 h/0,5 ml/min^{-1}, SEC: 40° C/ca. 1 h/0,5 ml/min^{-1})
  und mehrstündiges Nachspülen mit Bidest. Wasser.

- HPLC-Bedingungen

  – SEC

Säule:	Shodex KW-803 + Vorsäule
Eluent:	Eluent A, isokratisch
Fluss:	1,75 ml/min
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Einspritzvolumen:	<100 µl

Totvolumen:	5,7 ml
Loopvolumen:	1,0 ml
– AEX	
Säule:	EC 50/4 Nucleosil 4000-7, ohne Vorsäule
Transfer in Loop:	0,4 ml
Entwicklung:	Gradientenprogramm
Chromatogrammzeit:	22 min
Säulentemperatur:	40° C
Totvolumen AEX:	0,3 ml
Detektion (SEC, AEX):	UV: 280 nm, FL: ex295 nm, em336 nm. Gain: 10

– Gradientenprogramm AEX bei SEC-AEX-Trennungen

Zeit Min	Eluent A %	Eluent B %	Eluent C %	Eluent D %	Fluss ml/min
0	10	0	0	90	1
6	10	0	0	90	1
12	0	100	0	0	1
14	0	100	0	0	1
14,5	0	0	100	0	1
16,5	0	0	100	0	1
17	10	0	0	90	1
22	10	0	0	90	1

Ergebnisse

– SEC-Trennung

Die Banden der einzelnen Proteine der Referenzgemische «Milcheiweiss» und «Eiklar» eluierten unvollständig aufgetrennt von der SEC-Säule. Konzentrationsabhängige Retentionszeitverschiebungen und messbare Proteinrückstände auf der SEC-Säule wurden nicht beobachtet. Die bestimmten Wiederfindungen waren

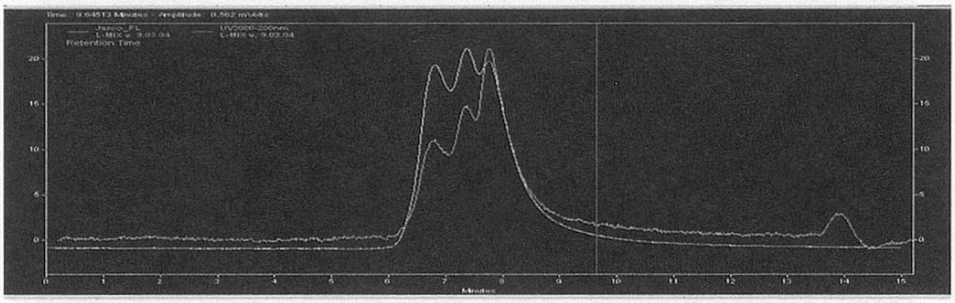

Abbildung 3 **SEC-Trennung von «Milcheiweiss» Referenzgemisch: Standardgemisch aus α/β-Casein**
(Cas)/α-Lactalbumin (α-LA)/β-Lactoglobulin (β-LG)/(Lactoferrin (Lf)), je ca. 50 µg/ml) gelöst in Eluent A. SEC-Elutionsreihenfolge: t_R(Cas)<t_R(β-LG)<t_R(α-LA)<t_R(Lf). Blaue Kurve: UV 280 nm, gelbe Kurve: FL (ex295nml em344nm, Eluent A), Fluss: 1,0 ml, eingespritztes Volumen: 30 µl

durchwegs >90 % (nicht gezeigt). Ein Chromatogramm von «Milcheiweiss» ist in der Abbildung 3 zu sehen.

Man sieht, dass α-Casein und β-Casein in einem Peak (t_R: 6,8 min) eluierten. Bei β-LG (t_R: 7,4 min) und α-LA (t_R: 7,7 min) sind zwei Peakmaxima zu erkennen. Die Differenz der Retentionszeiten von α-LA und β-LG entspricht der Breite eines Proteinpeaks auf halber Höhe. OA und CA eluierten in einem Peak mit einer Schulter («Eiklar»-Referenzgemisch, nicht gezeigt). Wurden die Proteinlösungen wiederholt eingespritzt, resultierten Chromatogramme mit identischen Retentionszeiten, unabhängig davon ob die Proteine einzeln oder im Gemisch in das SEC-System eingespritzt wurden (Tab. 1).

Tabelle 1
Präzision der SEC (Retentionszeit, Peakhöhe), überprüft an mehrfach wiederholten «Milcheiweiss»-Auftrennungen. «Milcheiweiss»: 30–45 µg/ml je Protein; β-LG* (53 µg/ml): als Einzelprobe eingespritzt. Messbedingungen: FL(ex295|em344nm, Eluent A), Fluss: 1,0 ml/min, eingespritztes Volumen: 30 µl

Parameter	*Einheit*	*a/b-Cas*	*b-LG**	*β-LG*	*α-LA*
Messpunkte	n	4	6	6	6
Retention (t_R)	min	6,78	7,38	7,40	7,70
Std.abw. s_{tR}	min	0,05	0,35	0,05	0,05
Peakhöhe h	mV	20080	15760	21900	20540
Std.abw. s_h	mV	450	340	150	200
Std.abw. rel.	%	2,2	2,3	0,7	1,0

Die Daten in Tab. 1 zeigen, dass β-LG, ob einzeln oder als «Milcheiweiss»-Proteingemisch eingespritzt, stets nach $t_R = 7{,}4 \pm 0{,}05$ min eluierte. Die bestimmten Peakhöhen streuten mit Standardabweichungen von ≤3 %. Die β-LG-Peakhöhenunterschiede zwischen der Einzelprobe und dem «Milcheiweiss»-Gemisch können durch Beiträge von benachbarten Peaks (α-LA und α/β-Casein) erklärt werden.

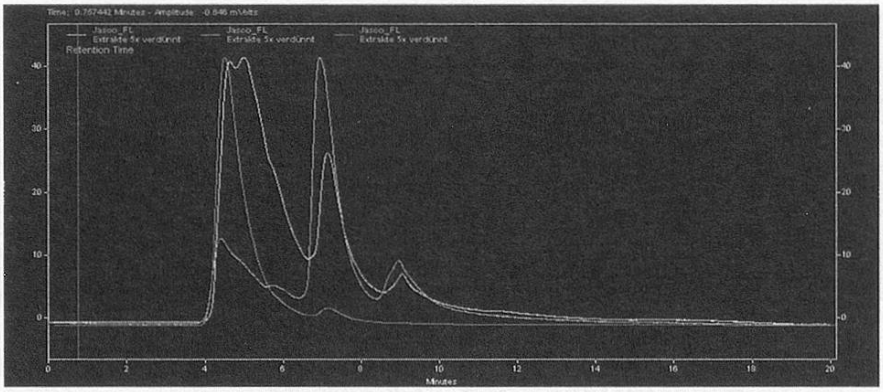

Abbildung 4 **Die SEC-Chromatogramme der Extrakte «Weizen», «Gerste» (je 5× verdünnt) und «Soya» (40×) sind in dieser Abbildung einander überlagert** (Detektion: FL (em295nm|ex344nm, Eluent A), eingespritztes Volumen: 30 µl, Fluss 1,75 ml/min)

Auch Proteine von Harnstoffextrakten (2,0 g Probe/20 ML Harnstoff, c (Harnstoff) = 6 mol/l) aus Weizen, Gerste, Sesam, Mandeln, Erdnüsse, Soya, Karotten, Sellerie, Fisch und Crevetten, die als Referenzlösungen bei immunologischen Dot Plot Tests eingesetzt werden (Lit. 8), liessen sich mittels SEC ähnlich entwickeln (Abb. 4, 5).

Die Chromatogramme der verschiedenen Extrakte von Weizen, Gerste, Sesam, Mandeln, Erdnüsse, Soya, Karotten, Sellerie, Fisch und Crevetten unterschieden sich erwartungsgemäss deutlich voneinander. Als Beispiele sind in Abb. 4 die Chromatogramme der Extrakte Weizen, Gerste und Soya aufgeführt. Unabhängig davon, ob die Extrakte nachverdünnt (5–50×), mehrmals wiederholt, oder in einer Serie von verschiedenen Extrakten eingespritzt wurden, stets resultierten bei den entsprechenden Extrakten vergleichbare Chromatogramme. Bemerkenswert ist, dass unter UV-Licht chromatographische Banden detektiert wurden, die unter Fluoreszenzbedingungen fehlten (Abb. 5).

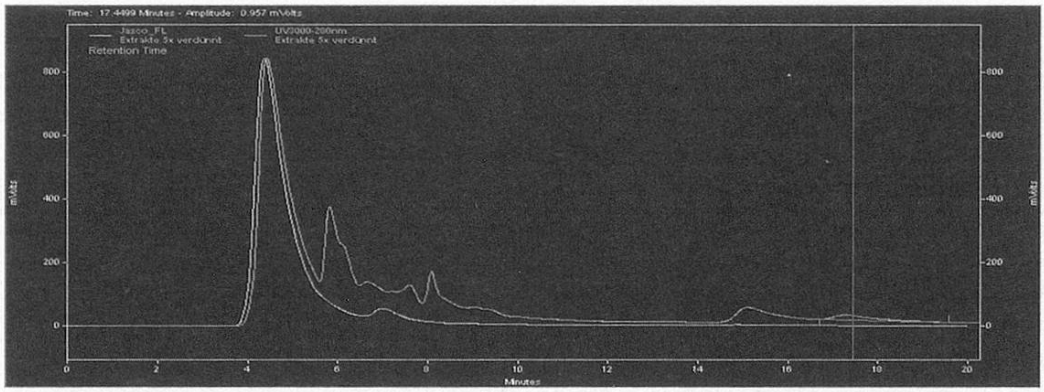

Abbildung 5 **SEC-Auftrennung einer Soya-Extrakt-Probe (je 2,0 g/20 ml c (Harnstoff) = 6 mol/l, 2× verdünnt, eingespritztes Volumen: 30 µl, Fluss: 1,75 ml/min).** Gelbe Kurve: FL (em295nmlex344nm, Eluent A), blaue Kurve: UV 280 nm

– SEC-AEX-Trennung

Die Referenzgemische von «Eiklar» und «Milcheiweiss» wurden, wie oben bereits erwähnt, bei reinen AEX-Trennungen ebenfalls nur unvollständig aufgetrennt. Wurde beispielsweise unter vergleichbaren AEX-Elutionsbedingungen «Milcheiweiss» in das System eingespritzt, eluierten die Proteine α-Casein und β-Casein und auch α-LA und β-LG je gemeinsam in leicht geschifteten, basisliniengetrennten Peaks (nicht gezeigt). Anders verhielten sich die erwähnten Proteine im gekoppelten SEC-AEX-Trennsystem (Abb. 6, Tab. 2).

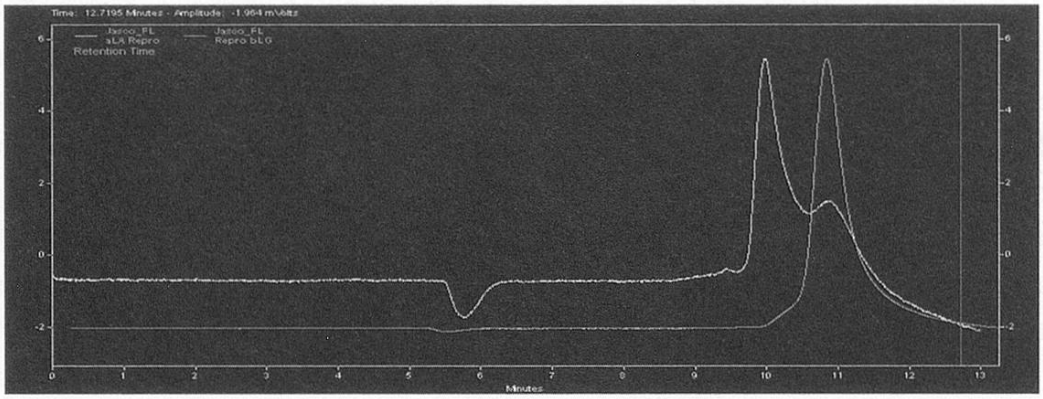

Abbildung 6 **Die SEC-AEX-Chromatogramme der Proteine von α-LA (gelbe Kurve) und β-LG (blaue Kurve) aus zwei verschiedenen «Milcheiweiss»-Auftrennungen sind in der Abbildung festgehalten.** Proteinkonzentrationen: 28–30 µg/ml je Protein, Detektion: FL (ex 295 nm|em 344 nm), eingespritztes Volumen: 30 µl

Tabelle 2
Präzision des SEC-AEX-Trennsystems (Retentionszeit, Peakhöhe), überprüft an mehrfach wiederholten Auftrennungen eines «Milcheiweiss»-Proteingemisches, Proteinkonzentrationen: 275–290 µg/ml je Protein, Messbedingungen: FL (295nm/344nm, Eluent (A)B), eingespritztes Volumen: 30 µl

Parameter	*Einheit*	*α-LA*	*β-LG*
Messpunkte	n	6	6
Retention (t_R)	min	9,99	10,58
Std.abw. s_{tR}	min	0,01	0,02
Peakhöhe h	mV	59270	72480
Std.abw. s_h	mV	790 (1,3 %)	368 (0,50 %)

Die «Milcheiweiss»-Proteine eluierten im gekoppelten Trennsystem in der Reihenfolge t_R(Cas)<t_R(α-LA)<t_R(β-LG)<t_R(Lf). α-LA und β-LG liessen sich mit einer Auflösung von R=1,0 trennen (Abb. 6). β-LG eluierte ohne α-LA-Anteile. Im Chromatogramm von α-LA sind Beiträge von β-LG (<10 %) zu erkennen. Gegenüber dem reinen SEC-System verbesserte sich die Trennleistung um einen Faktor 3 (Tab. 2). Ein ähnliches Verhalten zeigten Auftrennungen von «Eiklar»-Gemischen. OA und CA liessen sich gegenüber SEC-Trennungen ebenfalls um den Faktor 3 verbessert auftrennen. Die Auflösung R betrug R=0,70. Die Retentionszeiten der genannten Proteine lagen bei 10,0 min (α-LA), 10,9 min (β-LG), 9,5 min (CA) und 10,1 min (OA). Die Peakhöhen streuten bei wiederholten Messungen (Proteinkonz. ca. 50 mg/ml) mit Standardabweichungen von <3 % (Ausnahme OA: 5 %, Tab. 2). Die Protein-Transferraten (Quotient: detektierte Proteinanteile/in SEC eingespritzte Anteile) betrugen 30–35 %. Unter den gewählten Messbedingungen lagen die Bestimmungsgrenzen für die einzelnen Proteine bei 0,5–1 µg. Die fluoreszen-

spektrometrisch quantifizierten Peakhöhen von α-LA und β-LG verhielten sich bei Korrelationskoeffizienten von $R^2 > 0{,}99$ linear im Konzentrationsbereich von 30–450 µg Protein/ml Lösung (Abb. 7).

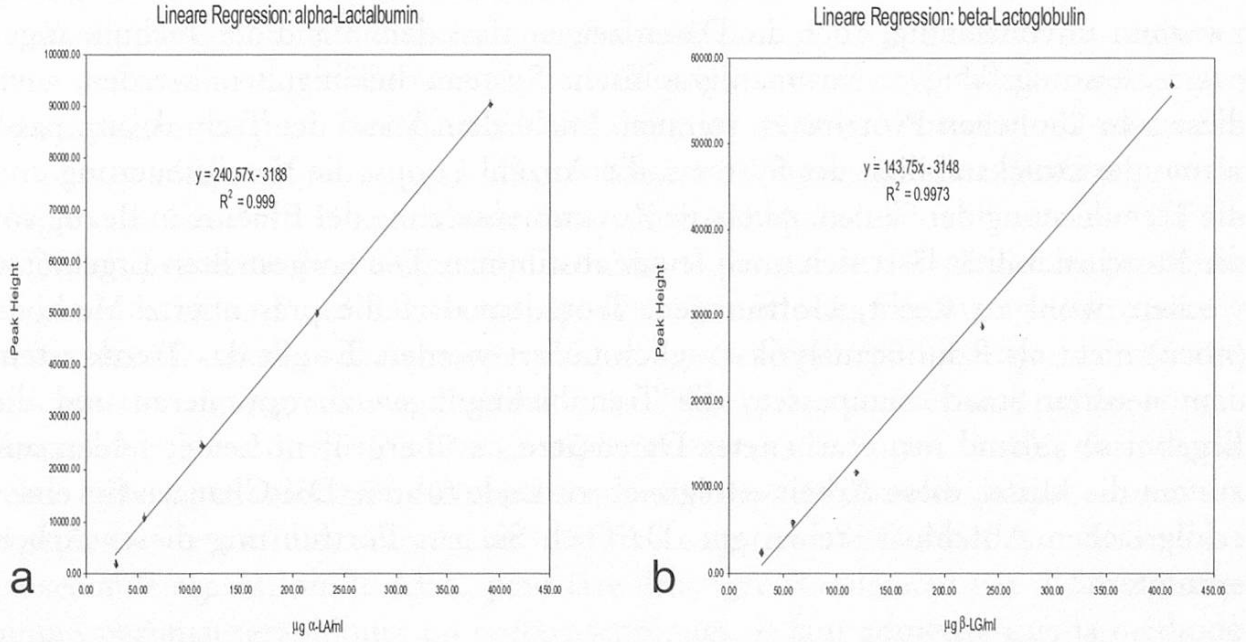

Abbildung 7 **Lineare Regressionen von Peakhöhe vs. Proteinkonzentration von α-LA und β-LG, Proteinkonzentrationen: 30–450 µg/ml je Protein, Detektion: FL (ex 295 nmlem 344 nm), eingespritztes Volumen: je 30 µl**

An β-LG aufgestockte Extrakte von Milchprodukten (Energy milk, Kräuterbutter, Butter, Molke, Milchserum zeigten Wiederfindungen von 90±17%. Vergleichbare Trends wurden auch bei OA und CA beobachtet. Leider verunmöglichte die noch vorhandene Überlappung der genannten Banden in den Chromatogrammen der SEC-AEX-Trennungen die Bestimmung des Konzentration/Signal-Verhältnisses in hinreichend engen Fehlergrenzen.

Diskussion, Schlussfolgerung

Die Ausführungen im Kapitel Ergebnisse zeigen: Proteine in Extraktgemischen lassen sich in der vorgegebenen Anordnung SEC-AEX ohne Veränderung der Proteine mit hinreichender Präzision einfach und vollautomatisch bestimmen. Gegenüber den verwendeten Einzelsäulen weist das Trennsystem eine deutlich gesteigerte Auflösung auf und bleibt in Bezug auf andere Detektions- und Chromatographiearten flexibel. Die AEX-Säule kann leicht durch CE- oder MS-Module ersetzt, oder, beispielsweise, bei Aufreinigungen für die DNA-Analyse weggelassen werden. Die SEC-Säule kann als Herz der vorgestellten Methode bezeichnet werden. Sie garantiert die weitgehende Unabhängigkeit des Trennsystems vom Extraktionsmedium

und ermöglicht, im Gegensatz zum Trennsystem von *Evans* (9), die Trennung der Analyte unter proteinstabilen Lösungsbedingungen auszuführen. Chromatographische Entwicklungen mit Eluentgemischen, die geringe gelöste Anteile von Molekülen enthielten, welche die wichtigsten adsorptiven Molekülgruppen der Proteine pufferten und/oder maskierten, zeigten die besten Trennungen. α-LA und β-LG liessen sich trennen und auswerten. Die Trennung der Proteine OA und CA gelang zwar nur unvollständig, doch die Daten zeigen, dass dem Stand der Technik angepasste, leistungsfähigere chromatographische Systeme befähigt sein werden, auch diese sehr ähnlichen Proteine zu trennen. Nicht dem Stand der Technik angepasst waren die Druckstabilität des Systems, die Anzahl Loops, die Ventilsteuerung und die Trennleistung der Säulen. Auch die Zusammensetzung der Eluente in Bezug auf die Proteinstabilität lässt sich noch feiner abstimmen. Die vorgestellten Ergebnisse wecken, wohl zu Recht, Hoffnungen. Trotzdem darf die präsentierte Methode (noch) nicht als Routineanalytik tauglich taxiert werden. Es gilt das Trennsystem dem neusten Stand anzupassen, die Trennbedingungen zu optimieren und die Ergebnisse anhand neu erarbeiteter Datensätze zu überprüfen. Leider fehlen mir zurzeit die Mittel, diese Arbeit erfolgreich zu Ende führen. Die Chancen für einen erfolgreichen Abschluss stehen gut. Darf ich Sie zur Fortführung dieser Arbeit ermuntern?

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich für die vielen, sehr unterschiedlichen Hilfeleistungen bei Dr. G. Schäppi, V. Konrad, B. Meier, Team Mykotoxine, Kant. Labor ZH, Zürich, M. Boppart, Zürich, R. Villari, CH-Vich, B. Delz, P. Arpagaus und D. Beck, Thermo Finnigan, CH-Allschwil, W. Döbeli, Prolab Instruments GmbH, CH-Reinach und beim Team der SGLUC, CH-Sion.

Zusammenfassung

Die Kenntnis der Proteinmuster in Lebensmitteln ist aus technologischer, ernährungswissenschaftlicher und gesundheitlicher Sicht, aber auch aus dem Blickwinkel der Kontrollorgane erwünscht. Leider sind die entsprechenden Daten selten verfügbar. Methoden fehlen, welche die einfache, zielsichere und umfassende Bestimmung der Proteine ermöglichen. In dieser Arbeit wird eine zweidimensionale chromatographische Methode (SEC-AEX) vorgestellt, die die Proteingemische «Milcheiweiss» und «Eiklar» in ihre Komponenten zu trennen vermag. Durch die Vorschaltung der SEC-Säule können Extrakte von unterschiedlichster Art in das System eingespritzt werden. Störreaktionen (Ausfällungen, Aggregationen, Zersetzungen und Komplexreaktionen) sind durch die pH-Wahl und die Zusammensetzung des Eluenten minimiert. Beispielsweise lassen sich Harnstoffextrakte von Weizen, Soya, Sellerie u.a.m., die für immunologische Dot Plot Tests eingesetzt werden, reproduzierbar und vollständig aus der SEC-Säule eluieren. Die Methode ist sehr flexibel in Bezug auf den zweiten Trennschritt. Neben AEX ist die

Anwendung von weiteren chromatographischen und/oder spektroskopischen Methoden (CE, MS etc.) möglich. Die Methode ist noch nicht ausgereift. Die Möglichkeiten der Methode sind noch auszuloten und das System dem Stand der Technik anzupassen.

Résumé

Pour perfectionner les techniques industrielles, pour augmenter les connaissances en matière de nutrition et pour améliorer le contrôle officiel, il est nécessaire de connaître les protéines particulières dans les denrées. Puisque des méthodes simples et adéquates ne sont pas disponibles, ces données sont inexistantes pour la plupart des aliments. Une méthode chromatographique en deux dimensions (SEC-AEX) est présentée dans ce travail. La méthode permet de déterminer les protéines du lait et du blanc d'œuf. Des extraits peuvent être injectés sans aucune autre purification dans le système chromatographique. Les réactions périphériques, comme la précipitation, la dégradation, l'adhésion ou l'absorption sont évitées par les conditions de l'effluent de la SEC. Par exemple les extraits de l'urine du blé, du soja, du céleri et des autres aliments, éléments standards préparés pour les analyses immunologiques, étaient efflués complet de la SEC. Le système SEC-AEX est très flexible. La seconde séparation, le AEX, peut être échangée simplement par d'autres techniques chromatographiques ou spectroscopiques. Il faut admettre que la méthode SEC-AEX n'est pas encore au point. La système doit être adapté aux techniques actuelles ; donc la résolution chromatographiques doit être perfectionné.

Summary

The knowledge of protein patterns in food is desirable for technological reasons, nutrition and health. Unfortunately these data are seldom deliverable. Corresponding methods are missing. In this work a two-dimensional chromatographic method (SEC-AEX) is presented, which allows to separate mixtures of milk and whey proteins. Due to the primary separation of the proteins by SEC, the extract solutions can be loaded on the system without any further purifications. This is a great advantage of this method. Precipitations, degradations, aggregations and further interfering reactions are avoided by pH 6–8 and by the composition of the liquid phase of the SEC. For example urea extracts of proteins of wheat, soya, celery and other food substrates, which are generally used for immunological dot plot analysis, could be eluted completely from the SEC column. Finally, other configurations or applications of the presented system are possible. The second separation step, the AEX, can easily be replaced by other techniques. However, further work is still needed. The chromatographic separation of the SEC-AEX method has to be improved.

Key words

Protein, protein pattern, SEC, AEX, two-dimensional HPLC, food

Referenzen

1 *Belloque J., Garcia M.C., Torre M. and Marina M.L.:* Analysis of Soyabean Proteins in Meat Products: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **42** (5), 507–532 (2002)

2 *Franzen M., Pabst H., Schulte-Coerne H. und Gravert H.O.:* Quantitative chromatographische Trennung von Milchproteinen. Milchwissenschaft, **50** (9), 483–488 (1995)

3 *Holt C., McPhail D., Nevison I., Nylander T. and Otte J. et al.:* Apparent Chemical Composition of Nine Commercial or Semi-Commercial Whey Protein Concentrates, Isolates and Fractions. Int. J. Food Science and Technology, **34**, 543–556 (1999)

4 *Huebner F.R. and Bitz J.A.:* Quantitation and Reproducibility Problems in Reversed-Phase and Size-Exclusion HPLC Analyses of Wheat Proteins. Cereal Chem., **76** (2), 299–302 (1999)

5 *Havea P., Singh H. and Creamer L.K.:* Formation of New Protein Structures in Heated Mixtures of BSA and α-Lactalbumin. J. Agric. Food Chem. **48**, 1548–1556 (2000)

6 *Galani D. and Apenten R.K.O.:* Heat-induced Denaturation and Aggregation of β-Lactoglobulin: Kinetics of Formation of Hydrophobic and Disulphide-linked Aggregates. Int. J. Food Science and Technology, **34**, 467–476 (1999)

7 *Pan P. and McLuckey S.:* Electrospray Ionization of Protein Mixtures at Low pH. Anal. Chem., **75**, 1491–1499 (2003)

8 *Schäppi G.:* Persönliche Mitteilung, Kantonales Labor ZH, CH-Zürich (2004)

9 *Evans Ch.R. and Jorgenson J.W.:* Multidimensional LC-LC and LC-CE for High-Resolution Separations of Biological Molecules. Anal. Bioanal. Chem. **378**, 1952–1961 (2004)

Korrespondenzadresse: F. Wegmüller, Mühletalweg 14, CH-4600 Olten,
E-Mail: fritz.topas@bluewin.ch